原 著 論 文

義歯床の維持に関与する唾液蛋白質

—二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によるヒト顎舌下腺唾液の分析—

上村 正人 芝 燐彦 鈴木 潔 小溪 徹彦

Human Salivary Proteins Concerning the Retention of Denture Base

—Analysis of Human Submandibular-Sublingual Saliva by Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis—

Masato Kamimura, Akihiko Shiba, Kiyoshi Suzuki and Tetsuhiko Kotani

Abstract : The purpose of this study was to examine the role of protein of human submandibular-sublingual saliva in the retention and stability of dentures. This study was performed by analyzing how changes in protein affect viscosity.

Submandibular-sublingual saliva samples obtained from 15 subjects, each with a healthy oral cavity and good general condition, were studied. A Kette type rotary viscometer Low-Shear 30 (Contraves) was used to determine viscosity. The analysis of salivary proteins was achieved by combining microscale two-dimensional SDS-PAGE with silver staining.

In high viscosity saliva, 44 protein spots were detected. These spots appeared in the range of pI 3.8~10.0 and estimated molecular weight of 15,000~1,000,000. In low viscosity saliva, approximately 30 protein spots were detected. These spots appeared in the range of pI 3.8~10.0 and estimated molecular weight of 15,000~1,000,000.

There was a significant correlation between the concentration of high molecular weight proteins with an estimated weight of more than 700,000 and viscosity ($r=0.71$, $p<0.01$). High molecular weight proteins (with an estimated weight of more than 700,000) were characterized into five groups to the isoelectric point. The two groups (more than pI 7.0 and pI 4.1~5.1) showed significant correlations with high viscosity of human submandibular-sublingual saliva ($r=0.73$ and $p<0.01$ for both groups).

Key words : human submandibular-sublingual saliva, saliva viscosity, high molecular weight proteins, two-dimensional SDS-PAGE, denture retention

I. 緒 言

唾液は口腔内の環境の保持にとって重要な役割を演じていると同時に、義歯を口腔内に装着し、機能させる場合にも必要不可欠なものである。

義歯の維持因子には機械的、生物的、物理的因子があるが、このうち物理的因子、すなわち物理的維持力はその維持の大半をまかなっているとされている¹⁾。物理的維持力は義歯床下の陰圧によって得られる維持力と、唾液が介在することによって生じる維持力に大別される。

義歯床下の陰圧は、義歯の離脱開始から経時的に減少し、それと同時に義歯床の維持力も減少することから、義歯床下の陰圧がその維持力に関与しているといわれている²⁾。しかし、床下粘膜と唾液の粘着力、あるいは唾液自体の有する凝集力、粘性、表面張力のほうがより重要であ

昭和大学歯学部第三歯科補綴学教室（主任：芝 燐彦教授）
The Third Department of Prosthodontics, Showa University
School of Dentistry (Chief: Prof. Akihiko Shiba)
平成9年7月30日受付

るとし唾液の性状と義歯床との関係が報告されている³⁻¹²⁾。当教室でも、特に唾液の粘性が果たす役割は重要であると考え、義歯床の維持力と介在する唾液の粘度との関係を検索しており、特に唾液の粘度の物理的性状は唾液に含まれている蛋白質成分の違いが大きく関与しているとして、1次元電気泳動法を用いて分析を行ってきた¹³⁻²⁸⁾。近年、2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動法²⁹⁾が開発されて以来、広く応用されるようになった。この泳動法は1次元電気泳動法と比較して、より詳細な分析情報が得られると報告されているが、唾液蛋白質と粘性との関係については未だ報告されていない。

そこで本研究では顎舌下腺唾液を用いて、唾液中に含まれる蛋白質を2次元 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（以下2次元 SDS-PAGE と略す）により分析し、同時に回転粘度計を用いて粘度の測定を行い、唾液の粘度と唾液中に含まれる蛋白質成分との関係を検索した。

II. 材料と方法

1. 材料の採取法

被験者は全身の疾患がなく、口腔内も臨床的に健常な人15名（男性10名、女性5名、年齢23~38歳）である。実験材料にはこれらの被験者より採取した顎舌下腺唾液を用いた。採取時間はいずれも昼食前とし、無刺激下で採取を行った。口腔内を洗浄した後、耳下腺開口部を簡易防湿を行い、口腔底に貯留した唾液をディスポーザブルピペットにて吸引する吸引法³⁰⁾により採取した。

2. 電気泳動法

1) 装置および器具

マイクロ2次元電気泳動にはマイクロ多検体2次元電気泳動装置 BS-8 B セット（富士理研社）、直流安定化電源は FUJI OX（富士理研社）、そして DIGI-POWER（ATTO 社）を使用した。

2) 試薬および消耗品

アクリルアミド、N-N' メチレンビスアクリルアミド (BIS)、トリアミノメタンは半井テスク社製、テトラメチレンジアミン (TEMED) はバイオラッド社製、アンホライン (pH 3.5~10 および pH 3.5~5) はファルマシア LKB 社製、分子量マーカーはファルマシア LKB 社製の HMW Kit E (Native) (チログロブリン 669,000, フェリチン 440,000, カタラーゼ 232,000, 乳酸デヒドロゲナーゼ 140,000, アルブミン 67,000), pI マーカーはファルマシア LKB 社製の pI カリブレーションキット 3~10 を使用した。その他の試薬は和光純薬、岩井化学、昭和化学社製の特級試薬を用いた。

3) ゲル調製法

ゲルの調製は奥山らの方法³¹⁾に準じて行った。すなわ

ち、1次元用のキャピラリーゲル作製はポリアクリルアミドゲル濃度を 4.27% とし、アンホライン pH 3.5~10 を 2.13%, pH 3.5~5.0 を 0.53% とした。界面活性剤としては非イオン性のノニデット P 40（以下 NP 40 と略す）を 1% 加えた。

2次元用の平板ゲル作製はポリアクリルアミドゲル濃度を 4~17% とし、界面活性剤として SDS を 1% 加えた。

4) 電気泳動法

(1) 試料調製法

顎舌下腺唾液 1 ml に対しショ糖粉末 0.4 g と 1% BPB 液 20 μ l を加えてよく混合し、その 4 μ l を負荷した。

(2) 1次元目等電点電気泳動法

奥山らの方法³¹⁾に準じた。すなわち陽極液に 0.01 M リン酸液、陰極液には 0.04 M 水酸化ナトリウム液を使用した。泳動ははじめに定電流でキャピラリー 1 本あたり 0.1 mA で泳動を行い、初期電圧約 50 V が 300 V に達したところ（約 20 分間）で定電圧に切り替えて、さらに 40 分間 300 V で泳動を行った。

(3) 2次元目密度勾配ゲル電気泳動法

奥山らの方法³¹⁾に準じた。すなわち泳動用緩衝液には 0.05 M トリス-0.38 M グリシン緩衝液を用い、ゲル 1 枚あたり 10 mA の定電流で行い、アルブミンの位置がゲル下端から約 15 mm のところに達したところをもって泳動を終了した（約 60 分間）。

5) 染色法

電気泳動後の蛋白質染色法は Oakley 法の銀染色法³²⁾を用いた。

3. 唾液の粘度測定法

クエット型回転粘度計 Low-Shear 30 (Contraves 社製) を用いて測定を行った。測定カップの半径は 6 mm, ローターの半径は 5.5 mm, 高さは 20 mm で先端部の切れ角は 20° のものを使用した。採取した顎舌下腺唾液 1 ml を試料とし、測定カップ内に気泡をいれないように静かに注入した後ローターをセットし、注入完了 3 分後に測定を開始した。

測定中の温度は循環恒温槽クールニクスを用いて 37°C に保った。ずり速度は 0~1.28 s⁻¹ (0~0.98 rpm) とし、回転は 5 分間均一に加速するように、ランプタイム 5 分間のプログラムを作製し、X-Y レコーダーでフローカーブを描記した。測定粘度はずり速度 1.28 S⁻¹ の時点で算出した。

4. 唾液中の蛋白質の定量分析

得られた蛋白質スポットはパーソナルデンシトメーター PD 110 (モレキュラーダイナミクス社) にて定量分析を行った。

染色後のゲルをガラストレイに置き、スキャンニングゲ

リアを指定し測定データをハードデスクに取り込み、CRT 上で画像をみながらイメージアナリシスソフトウェア “Image Quant” により解析を行った。

III. 結 果

1. 高粘度唾液と低粘度唾液の蛋白質泳動像の比較

顎舌下腺唾液を用いて、高粘度唾液と低粘度唾液の蛋白質泳動像の比較を行った。唾液の粘度の評価は、片山ら³³⁾、鈴木²⁷⁾の報告を参考にし、20 mPa・s 以上を高粘度、10 mPa・s 以下を低粘度とした。

15 例の唾液について粘度測定を行った結果、高粘度は 4 例で 27%，低粘度の唾液は 8 例で 53% であった。残り 3 例は 10~20 mPa・s の粘性を持ついわゆる中粘度の唾液であった。図 1-a~d には、高粘度唾液 4 例の蛋白質泳動像と各々の蛋白質マップのシェーマを示した。図 2 には高粘度の唾液の一例として図 1-a の 33.12 mPa・s の粘度を示す唾液のフローカーブを示した。図 3-a~d には、低粘度唾液 4 例の蛋白質泳動像と各々の蛋白質マップのシェーマを示した。図 4 には、低粘度の唾液の一例として、図 3-a の 4.28 mPa・s のフローカーブを示した。高粘度唾液の泳動像は低粘度唾液と比較すると、推定分子量 80~100 万の高分子蛋白質がすべての症例の唾液に 3 種類以上出現し、

かつ濃染された。また、低粘度の唾液と比べてゲル左上部、すなわちアルカリ側の高分子蛋白質部分にアルカリ側から酸性側にかけて長くかつ濃染されるスポットがみられるのが特徴的であった。

低粘度の泳動像では、推定分子量 80~100 万の部位にスポットがみられたものの、1 つか 2 つのスポットとしてしか現れず、また染色濃度も低かった。推定分子量 20 万の

図 2 Flow curve of high viscous human submandibular-sublingual saliva
高粘度唾液のフローカーブ

図 1

a~d: Electrophoretic patterns and protein maps of five high viscous human submandibular-sublingual saliva samples
a~d: 高粘度唾液 4 例の泳動像と蛋白質マップ

図 3

a ~ d : Electrophoretic patterns and protein maps of four low viscous human submandibular-sublingual saliva samples

a ~ d : 低粘度唾液 4 例の泳動像と蛋白質マップ

図 4 Flow curve of low viscous human submandibular-sublingual saliva
低粘度唾液のフローカーブ

スポットは pI 5~6 と pI 6~7 と 2 つのスポットに分かれた。ゲル中央部から下端部における比較的低分子の蛋白質スポットがより高濃度に染色された。

高粘度および低粘度の唾液蛋白質の違いをより明らかにするため、個々に出現したスポットをまとめた蛋白質マップを作成した。また出現したスポットの分子量、pI および出現頻度を求めた。20 mPa·s 以上の粘度を示す高粘度の顎舌下腺唾液 4 例の蛋白質マップのシェーマを図 5-a

に示した。また 10 mPa·s 以下の低粘度を示す唾液 4 例の典型的な蛋白質マップのシェーマを図 5-b に示した。各スポットの出現頻度を知るため、蛋白質スポットに便宜的に数字を付けた。また各スポットの性状とその出現頻度をそれぞれ表 1 と 2 に示した。

高粘度の唾液では 44 個のスポットが得られ、ゲルの左上部に濃染されるスポットが出現する機会が多く、スポットの数も約 8 種類出現した。1 番高分子の蛋白質は推定分子量 80~100 万、1 番低分子の蛋白質は推定分子量 1 万 5 千~2 万と幅広く分布し、また、pI 3.8~10.0 と幅広く分布していた。

低粘度の唾液では 30 個のスポットが得られたが、高粘度の唾液と比較しスポットの数も少なく、かつ濃染されていなかった。

各々のスポットの特徴をみると、高粘度の唾液では高分子蛋白質が多く出現し、また濃染されており、かつ pI 7 付近で推定分子量が 80 万以上のスポット 1 が高頻度に現れるのが低粘度唾液にみられない特徴であった。また推定分子量 50~80 万のスポット 6, 7, 8 は高粘度、低粘度唾液のいずれにもみられたものの、出現頻度は高粘度唾液のほうが若干高かった。推定分子量 20 万前後のスポット 10, 11 は高粘度、低粘度唾液ともに高頻度に出現した。このことから顎舌下腺唾液特有の蛋白質であった。推定分

図 5

a : Composite protein map of four high viscous human submandibular-sublingual saliva samples

b : Composite protein map of four low viscous human submandibular-sublingual saliva samples

a : 高粘度唾液 4 例の合成蛋白質マップ

b : 低粘度唾液 4 例の合成蛋白質マップ

子量 10~20 万のスポットでは、高粘度唾液のほうが出現頻度が多く、かつスポットの数も多かった。推定分子量 5~10 万のスポットは低粘度唾液のほうが多かった。そしてスポット 23, 24 はほぼ 100% 出現していることから、顎舌下腺唾液特有の蛋白質であると考えられた。推定分子量 5 万以下では粘度との関係はみられず、むしろ個人差が多いようだった。ただし、スポット数としては高粘度唾液のほうが多く出現した。

2. 唾液の粘度と蛋白質濃度パーセントの関係

15 例の顎舌下腺唾液の粘度の測定を行い、それぞれの唾液を 2 次元電気泳動法にて分離し、定量分析を行い、粘度と唾液蛋白質濃度パーセントとの関係を見た。各唾液の粘度は 4.28~45.83 mPa・s に分布しており、平均 14.30 mPa・s であった。

定量分析は、まずゲル上で推定分子量 70 万以上の高分子蛋白質スポットと 70 万未満と 2 つのエリアに分け、粘性と蛋白質スポット濃度との間に相関があるかを調べた。さらに高分子エリアを等電点で 5 つのブロックに分割し、高分子蛋白質における各等電点と粘度との関係を見た (図 6)。5 つのブロックの等電点は各ゲルによって若干異なり、ブロックの境界部の値はオーバーラップするところもあるので標準偏差で表した。つまりブロック 1 は $pI 7.1 \pm 0.2$ 以上、ブロック 2 は $pI 6.2 \pm 0.4 \sim 7.1 \pm 0.2$ 、ブロック 3 は $pI 5.1 \pm 0.3 \sim 6.2 \pm 0.4$ 、ブロック 4 は $pI 4.1 \pm 0.2 \sim 5.1 \pm 0.3$ 、ブロック 5 は $pI 4.1 \pm 0.2$ 以下となる。

図 7 は、15 例の唾液の推定分子量 70 万以上の高分子蛋白質の濃度パーセントと粘度との関係を示したものである。横軸は粘度を、縦軸は濃度パーセントを表している。

濃度パーセントの平均は 10.71% であり、相関係数 0.71 と有意な正の相関がみられた。図 8-a~d には、b の部分の高分子蛋白質を pI で 5 つのブロックに分けた 1~4 のブロックの濃度と粘度との関係を示したものである。ブロック 5 はスポットが出現しなかったので表示していない。各ブロックの平均濃度パーセントはそれぞれ、1.73, 3.24, 4.62, 1.12% であった。またブロック 1, 2, 3, 4 の部分はそれぞれ相関係数が 0.73, 0.49, 0.36, 0.73 であった。特にブロック 1 と 4 は良好な正の相関がみられた。すなわち、推定分子量 70 万以上の $pI 7.1 \pm 0.2$ 以上、および $pI 4.1 \pm 0.2 \sim 5.1 \pm 0.3$ の部分の蛋白質が粘度と良好な相関を示した。このなかで有意差がみられたのはブロック 1 と 4 であった。

IV. 考 察

上顎の全部床義歯をはじめ、辺縁封鎖を期待できない下顎の全部床義歯や多数歯欠損の部分床義歯の維持は、義歯床粘膜面と床下粘膜面との緊密な適合とその間に介在する唾液が重要な役割を演じている^{3~12)}。口蓋腺唾液は上顎で、各唾液腺から分泌された混合唾液、特に顎舌下腺唾液は下顎では重要な因子である。その唾液成分中で表面張力も影響を及ぼすが、その主体は粘度であり、その粘度の物理的性状を担うものはそのなかに含まれている蛋白質成分であるといわれている^{13~28)}。したがって、各々の唾液の蛋白質成分を分析することは、唾液の粘度の違いを明らかにするために非常に重要な事項である。

本研究では顎舌下腺唾液を採取し、試料として用いた。それは唾液の採取が容易であり、また採取条件を一定にす

表 1 Estimated molecular weight and isoelectric point and frequency of occurrence of high viscous human submandibular-sublingual saliva protein spots
高粘度唾液蛋白質スポットの性状と出現頻度

スポット番号	推定分子量×10 ⁴	等電点	出現頻度
1	～80	～7	3/4
2	～80	6～7	3/4
3	～80	5～6	1/4
4	～80	5～6	1/4
5	～80	5	1/4
6	80～50	5～6	3/4
7	80～50	5～6	3/4
8	80～50	5	3/4
9	20	6～7	2/4
10	20	6～7	4/4
11	20	5～6	4/4
12	20～10	5～6	2/4
14	20～10	4～5	3/4
15	20～10	4～5	3/4
16	20～10	5	3/4
17	10	5	1/4
19	10～5	5	1/4
23	10～5	6～7	4/4
24	10～5	4～5	3/4
25	5～	6～7	3/4
26		6～7	1/4
27		6～7	1/4
28		5～6	1/4
29		5～6	1/4
30		6～7	1/4
31		5～6	2/4
32		4～5	3/4
33		4～5	3/4
34		4～5	1/4
35		4～5	1/4
36		4～	2/4
37		7	1/4
38		5～6	2/4
39		5～6	2/4
40		5～6	1/4
41		5～6	1/4
42		5～6	2/4
43		6～7	3/4
44		5～6	1/4
45		5	2/4
46		4～5	3/4
47		4～5	2/4
48		4	2/4
49		6～7	2/4

N=4

表 2 Estimated molecular weight and isoelectric point and frequency of occurrence of low viscous human submandibular-sublingual saliva protein spots
低粘度唾液蛋白質スポットの性状と出現頻度

スポット番号	推定分子量×10 ⁴	等電点	出現頻度
2	～80	6～7	1/4
6	80～50	5～6	4/4
7	80～50	5～6	2/4
8	80～50	5	1/4
9	20	6～7	1/4
10	20	6～7	4/4
11	20	5～6	4/4
13	20～10	5～6	2/4
14	20～10	4～5	1/4
16	20～10	5	1/4
17	10	5	1/4
18	10	4～5	2/4
20	10～5	4～5	2/4
21	10～5	4～5	1/4
22	10～5	6～7	1/4
23	10～5	6～7	3/4
24	10～5	4～5	4/4
30	5～	6～7	1/4
32		4～5	2/4
33		4～5	1/4
34		4～5	1/4
36		4～	1/4
43		6～7	1/4
44		5～6	1/4
45		5	1/4
46		4～5	2/4
47		4～5	3/4
48		4	2/4
49		6～7	1/4
50		4	1/4

N=4

ることが可能であったためである。

唾液の粘度は、採取後経時的に低下することが知られているので粘度の測定および電気泳動は採取後ただちに行った。片山ら³³⁾は混合唾液の粘度分布は、0～10 mPa・s の低粘度が 65%、10～20 mPa・s の中粘度が 30%、20 mPa・s 以上の高粘度が 5% とし、また、鈴木²⁷⁾は全唾液を高、中、

図 6 Scanning area of molecular weight and isoelectric point
分子量と pI でのスキャンングエリア

図 7 Correlation between human submandibular-sublingual saliva viscosity and concentration of proteins with an estimated weight of more than 700,000
推定分子量 70 万以上の蛋白質の粘度と濃度の関係

低粘度に分類し、粘度が 10 mPa·s 以下の低粘度である全唾液は 27%，中粘度の 10～20 mPa·s である全唾液は 54%，そして高粘度の 20 mPa·s 以上の全唾液は 19% であったと報告している。このことから、本研究では便宜的に 10 mPa·s 以下を低粘度唾液、20 mPa·s 以上を高粘度唾液として実験を行った。また今回、中程度の粘度を持つ唾液を対象としなかったのは、粘度による泳動像の違いをより明確にすることを期待したからである。

試料の負荷量は、全唾液中に含まれる蛋白質の濃度と粘度との間には相関関係はみられなかったことから²⁷⁾，負荷させる試料の量は一定量とした。

2 次元電気泳動法は奥山ら³¹⁾の開発したマイクロ 2 次元電気泳動法を用いた。1 次元電気泳動法では、泳動が 1 回であるので蛋白質の持つ等電点か分子量のどちらか一方でしか分離できないので、1 つのバンドは必ずしも 1 つの蛋白質を示すというわけにはいかない。しかし、2 次元電気泳

ブロック 1

ブロック 3

ブロック 2

ブロック 4

図 8 Correlation between human submandibular-sublingual saliva viscosity and concentration on each blocks
各ブロックにおける粘度と濃度の関係

動法では、1 次元目で蛋白質の有する等電点の違いにより分離され、さらに 2 次元目では分子量の違いにより分離する方法であるので、完全に単一の蛋白質に分離できる特徴を有していると同時に、ミクロ化することにより泳動時間を大幅に短縮でき、しかも試料量が微量で行うことができるという特徴を有しているためである。

はじめに、唾液の粘度の違いと唾液蛋白質の 2 次元電気泳動の蛋白質マップの関係をみるために、低粘度と高粘度の唾液蛋白質マップを作製して比較を行った。顎舌下腺唾液の高粘度と低粘度の蛋白質マップをみると (図 4-a, b), 高分子部分では推定分子量 50~90 万の間に蛋白質スポットが存在することがわかる。そのなかでもスポット 8 は分子量と pI からみて α_1 -マクログロブリンと推察され、これは和田ら³⁴⁾が免疫化学的方法で全唾液を同定しているのと同じであった。また唾液蛋白質の高分子部分は高粘度の試料では 8 つのスポットに分かれたが、一方低粘度の唾液の試料では 4 つの蛋白質スポットにしか分かれなかった。高粘度の唾液で出現し、低粘度の唾液で出現しなかったのはスポット 1, 3, 4, 5 であった。またスポット 1 は高粘度の唾液にのみ出現し、かつ出現頻度からみて高粘度唾液特有な蛋白質と考えてよいであろう。またスポット 2 も低粘度唾液には 1 例のみ出現したものの、高粘度唾液には高頻度で出現したことから、同様に高粘度唾液特有の蛋白質であると考えられた。またスポット 3, 4, 5 は出現頻度が少ないので、これらが粘度と関係があるかどうかは本実験だけでは決定できなかった。

本実験で得られた蛋白質マップと、これまで 1 次元で分析した唾液蛋白質とを比較してみた。1 次元の SDS-PAGE で分析を行ったゲルと比較すると、鈴木²⁷⁾は推定分子量 80 万と 90 万の蛋白質バンドが、粘度の低下とともに染色性が低下したと報告しているが、その部分はスポットでみると 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 の部分である。1 次元 SDS-PAGE では 2 本のバンドとしてしかとらえられなかった蛋白質が 7 つの蛋白質に分離された。また本実験では低粘度の唾液にはスポット 1, 3, 4, 5 が得られなかったことから、残りの 2 つのスポットの有無によって粘度が異なるか、推定分子量 70~100 万の高分子部分の量の差によるかは本実験では不明であった。

また、芝²³⁾は混合唾液をアガロース等電点電気泳動法にて 20 本のバンドに分け、pI 4.9, 7.3 が主バンドであり、耳下腺唾液は 14 本のバンドで pI 6.8, 7.3 が主バンドであったと報告している。本実験結果で pI 4.9 のバンドに相当するのは出現頻度からみてスポット 24 であると考えられ、pI 7.3 のバンドに相当するのはスポット 9, 10, 11 あるいはスポット 23 に相当すると思われる、これらのスポットが漿液性である耳下腺唾液の主な蛋白質であると推察された。

また鈴木²⁴⁾は混合唾液、耳下腺唾液、顎下腺唾液をアガ

ロース等電点電気泳動法により分析しているが、主バンドは、pI 6~8 にある 3 本であり、漿液性の耳下腺唾液では中性域のバンドが一番多く濃染され、pI 4 より酸性領域のバンドはなく、粘液性の混合唾液は pI 4 付近に数本のバンドがみられたと報告している。本実験の結果からみても、顎舌下腺唾液では酸性領域のスポットが多かったことから、同様の結果が得られたものと考えている。

同様に 2 次元での唾液蛋白質の分析で比較すると、Mogi ら³⁵⁾は唾液中の特異蛋白質スポットとしての高分子量蛋白質として、推定分子量 15 万~17 万で pI 8.0~8.4 の範囲に等電点を持つ塩基性蛋白質であると報告し、推定分子量 40 万までの蛋白質までしか分離分析していない。本研究では推定分子量 50 万以下の蛋白質に関しては、ほぼ類似した蛋白質スポットが得られた。しかしながら、本研究で分離された唾液特有の高分子蛋白質は Mogi らではスポットとして検出していない。それらのスポットが出現しなかったのは泳動条件の違いによるものと考えられた。すなわち、筆者らは 1 次元目に非イオン性界面活性剤である NP 40 処理を施している。また 2 次元目に陰イオン性界面活性剤である SDS の処理を施しているが、Mogi らはそれらの処理を施していない。本実験では分子量マーカーも最大 669,000 までのものを使用しているのに対して、Mogi ら³⁵⁾の実験では 204,000 までのものしか使用していないため、高分子量の推定が困難であることが推察される。

唾液蛋白質のなかでも高分子を示す蛋白質に唾液ムチンがあり、それは 30~90% の炭水化物を含む糖蛋白質である。唾液ムチンには MG 1³⁶⁾ と MG 2³⁷⁾ があり、MG 1 の推定分子量は 100 万以上、蛋白質成分が 14.2% で 74.2% が炭水化物である。本研究でも高分子量の蛋白質を分離するのが目的であるから、分子量の推定が必要であった。本研究では 2 次元目に SDS を加えているので、市販の分子量マーカーは最大でも分子量 330,000 までしかない。SDS を加えていない native な状態で泳動を行った場合には 669,000 までの分子量の推定が可能であったことと、Manabe らの報告でも同一のゲル濃度で推定分子量約 90 万の IgM と推定分子量約 100 万の LDL を同定していることから、本方法でも 100 万近くまでの分子量は推定できると考えられた。また Manabe ら³⁸⁾は、分子量 100 万以上の蛋白質はゲル上端から約 3 ミリしか泳動できないことを指摘しているところから、本実験では分子量の推定は 90 万までとし、それ以上は 100 万以上の蛋白質と考えることにした。したがって 669,000 以上の蛋白質の分子量は正確な分子量といえるだろう。

鈴木²⁷⁾は 3~10% のグラジュエント SDS-PAGE により全唾液中に含まれる蛋白質の分析を行い、同時に回転粘度計によりその唾液の粘度を測定した結果、推定分子量 100 万、90 万、80 万の高分子蛋白質バンドが粘度と比例した

染色性を示し、唾液の放置による粘度変化では、粘度の低下とともに染色性の低下したバンドは糖蛋白質染色、蛋白質染色のいずれも推定分子量 100 万、90 万、80 万の高分子蛋白質バンドであることを報告した。顎舌下腺唾液中の蛋白質の定量分析を行った結果、粘度の高い唾液では高分子蛋白質の濃度が高い傾向がみられた。そして推定分子量 70 万以上の高分子の蛋白質の濃度パーセントは、平均で 10.71% であり有意差もみられたことから、推定分子量 70 万以上の高分子蛋白質が粘度に影響を及ぼすことがわかり、これはこれまでの研究結果と同様の結果であった。また、そのうちで本研究の特徴である等電点でさらにどの蛋白質が一番多く粘性に影響を及ぼしているのかをみるために、推定分子量 70 万以上の高分子蛋白質を等電点で 5 つのブロックに分けたところブロック 1, pI 7 付近とブロック 4, pI 4.5 付近が粘度との間での有意な正の相関がみられた。この 2 つのブロックは濃度パーセントがそれぞれ 1.73% と 1.12% であり、ブロック 2 と 3 の 3.24% と 4.62% と比較して値は小さいものの有意差が得られたことは、ブロック 2, 3 が通常の唾液の粘性を有しており、ブロック 1, 4 は、ブロック 2, 3 に加えて高粘度唾液特有のものであることが考えられた。このことはヒト顎舌下腺唾液中の高分子蛋白質には粘度の高い蛋白質と低い蛋白質とが混合して存在しており、等電点の異なる高分子蛋白質の量により、唾液の粘度の高低が決定されることが示唆された。

V. 結 論

義歯床の維持に関与するヒト顎舌下腺唾液の性状を調べるために、粘度の違いと唾液蛋白質成分の違いについての研究を行い、以下の結論を得た。

1. 高粘度の唾液では、44 個の蛋白質スポットが得られ、推定分子量は 1 万 5,000~100 万、等電点は pI 3.8~10.0 と分布していた。
2. 低粘度の唾液では、30 個の蛋白質スポットが得られ推定分子量は 1 万 5,000~100 万、等電点は pI 3.8~10.0 と分布していた。
3. 推定分子量 70 万以上の蛋白質においては、粘度と蛋白質濃度との間に有意な正の相関が得られた。
4. 推定分子量 70 万以上の高分子蛋白質を等電点で 5 つのブロックに分けたところ、pI 7.1±0.2 以上と pI 4.1±0.2~pI 5.1±0.3 のブロックの蛋白質が濃度と粘度との間に有意な正の相関が得られた。このことは、この 2 つのブロックの高分子蛋白質が粘度に深く関与していることが示唆された。

文 献

- 1) 林都志夫編. 全部床義歯補綴学 10-13, 東京: 医歯薬出版, 1982.
- 2) 河江 信, 五十嵐順正, 茂木知治ほか. 義歯床下の内圧測定に関する圧力変換器の応用 (第 1 報). 昭歯誌 2: 148-154, 1983.
- 3) Skinner EW, Campbell RL, Chung P. A clinical study of the forces required to dislodge maxillary denture bases of various designs. J Am Dent Assoc 47: 671-680, 1953.
- 4) Campbell RL. Some clinical observations regarding the role of the fluid film in the retention of dentures. J Am Dent Assoc 48: 58-63, 1954.
- 5) Tallgren A. A longitudinal study on denture retention. Odont Eskr 67: 314-335, 1959.
- 6) Östlund SLG. Saliva and denture retention. J Prosth Dent 10: 658-663, 1960.
- 7) 川添和幸, 浜田泰三, 山田早苗ほか. 義歯床の維持に関する研究 第 2 報 口蓋腺唾液の分泌と床の離脱力について. 補綴誌 18: 35-39, 1974.
- 8) 川添和幸, 浜田泰三, 山田早苗. 義歯床の維持に関する研究 第 3 報 床下介在唾液量の変化と離脱力について. 補綴誌 19: 289-293, 1975.
- 9) 川添和幸, 浜田泰三, 山田早苗. 義歯床の維持に関する研究 第 4 報 Tapping Movement 時における床下介在唾液量の変化について. 補綴誌 20: 286-290, 1976.
- 10) Colón A, Kotwal K, Mangelsdorff AD. Analysis of the posterior palatal seal and the palatal form as related to the retention of complete dentures. J Prosthet Dent 47: 23-27, 1982.
- 11) Singh RK, Tandan BK, Agrawal NK. The viscosity of saliva as related to the retention of maxillary complete dentures. J Indian Dent Assoc 54: 449-451, 1982.
- 12) 山田博明, 和泉憲一, 谷津 悟ほか. 唾液の粘性に関する基礎的検討 維持との関連性について. 補綴誌 29: 1183-1193, 1985.
- 13) 芝 輝彦. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第 1 報 口蓋腺唾液の採集法およびそのタンパク分画. 補綴誌 22: 644-649, 1978.
- 14) 芝 輝彦, 吉田二良, 佐野紀代子. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第 2 報 口蓋腺唾液タンパク電気泳動. 補綴誌 23: 32-37, 1979.
- 15) 芝 輝彦, 吉田二良, 佐野紀代子. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第 3 報 口蓋腺唾液糖タンパク電気泳動. 補綴誌 23: 419-422, 1979.
- 16) Shiba A, Sano K, Nakao M et al. Electrophoretic analysis of the protein in palatine saliva. J Prosthet Dent 43: 385-391, 1980.
- 17) 芝 輝彦, 吉田二良, 佐野紀代子. 義歯床の維持と口蓋腺唾液に関する研究 第 4 報 口蓋腺唾液の高分子タンパクの分析. 補綴誌 24: 406-409, 1980.
- 18) 吉田二良. 上顎全部床義歯の維持に関与する口蓋腺唾液タンパク, および糖タンパク分画の電気泳動による検索. 補綴誌 24: 603-613, 1980.
- 19) 芝 輝彦, 吉田二良, 五十嵐順正ほか. 義歯床の維持に関与す

- る各種唾液成分の電気泳動的分析. 補綴誌 26 : 50-54, 1982.
- 20) Shiba A, Yoshida J, Nakao M et al. Sodium dodecyl sulfate electrophoretic analysis of the protein in palatine saliva. J Prosthet Dent 47 : 246-251, 1982.
- 21) 鈴木 潔, 鈴木 満, 芝 燦彦. 銀染色法を用いた唾液タンパクの分析. 補綴誌 29 : 48-54, 1985.
- 22) Shiba A, Shiba KS, Suzuki K. Analysis of salivary proteins by thin layer sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis. J Oral Rehabil 13 : 263-271, 1986.
- 23) 芝 燦彦. 義歯床の維持に関与する唾液タンパクについて 第1報 アガロース等電点電気泳動法による唾液タンパク分析の基礎的検討. 補綴誌 30 : 948-953, 1986.
- 24) 鈴木 満. 義歯床の維持に関与する唾液タンパク質の高速液体クロマトグラフィー分析. 補綴誌 31 : 551-563, 1987.
- 25) 万代倫嗣, 奥山秀樹, 片山繁樹ほか. 義歯床の維持と唾液の粘性 第2報 義歯床の維持力と介在液の粘度の関係. 補綴誌 31 : 837-843, 1987.
- 26) 鈴木 潔, 小池 勝, 二家本見ほか. グラジエント SDS-PAGE による口蓋腺唾液のタンパクおよび糖タンパクバンドの分析. 補綴誌 31 : 1558-1565, 1987.
- 27) 鈴木 潔. 義歯床の維持に関与する唾液の粘性と唾液タンパク質の分析. 昭歯誌 8 : 185-202, 1988.
- 28) 万代倫嗣, 関口幸治, 高柳育行ほか. 義歯床の維持力に関する研究 第1報 介在液の粘度と口蓋形態. 昭歯誌 9 : 288-296, 1989.
- 29) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250 : 4007-4021, 1975.
- 30) 芝 燦彦, 保崎清人, 佐野紀代子. 唾液. Med Technol 9 : 1047-1061, 1981.
- 31) 奥山典生, 真鍋 敬. PGE 最新医学教育講座 No. 1123 ミクロ2次元電気泳動法とマイクロウェスタンブロットティング法の講習会. 初版, 東京: イムノメディカ, 1987.
- 32) Oakley BR, Kirsch DR, Morris NR. A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal Biochem 105 : 361-363, 1980.
- 33) 片山繁樹, 加藤義典, 中井義博ほか. 義歯床の維持と唾液の粘性 第1報 唾液粘度の測定. 補綴誌 29 : 440-448, 1985.
- 34) 和田 緑, 芝 紀代子, 芝 燦彦. ミクロ2次元電気泳動法による歯肉溝浸出液の蛋白質分析. 生物物理化学 33 : 319-325, 1989.
- 35) Mogi M, Hiraoka BY, Fukasawa K et al. Two-dimensional electrophoresis in the analysis of a mixture of human sublingual and submandibular salivary proteins. Archs Oral Biol 31 : 119-125, 1986.
- 36) Prakobphol A, Levine MJ, Reddy MS et al. Purification and characterization of a higher weight salivary mucin. J Dent Res 62 : 226 abstr, 1983.
- 37) Prakobphol A, Levine MJ, Tabak LA et al. Purification of a low-molecular-weight, mucin-type glycoprotein from human submandibular-sublingual saliva. Carbohydrate Res 108 : 111-122, 1982.
- 38) Manabe T, Takahashi Y, Higuchi N et al. Identification map of human plasma proteins : Micro two-dimensional electrophoresis followed by multiple immunoreplica technique. Electrophoresis 6 : 462-467, 1985.